

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15665

研究課題名(和文) 衝撃波外傷(爆傷)における呼吸・循環動態の変動に関する中素神経の役割

研究課題名(英文) Blast induced Traumatic Brain Injury and Cardiovascular Response

研究代表者

大西 光雄(OHNISHI, Mitsuo)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70597830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：爆弾テロで生じる衝撃波による損傷の解明は喫緊の課題である。ラット頭部への衝撃波による軽度脳損傷モデルを作成した。衝撃波を受けたラットの食量、体重は受傷後3日間減少した。衝撃波損傷脳をIba-1抗体で染色したところ、3日後、1週間後までは染まらず、2週後から視床・視床下部で濃染され活性化マクロファージの増加が示唆された。この時期のラットの行動試験を行ったところ、強制水泳試験ではcontrol群と比較して有意に無動時間が延長し“うつ”状態になっている可能性が示唆された。Y迷路試験においては記憶力の低下が示唆された。これは爆傷受傷後の兵士等で報告されている脳損傷の動物モデルとなることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Mild blast-induced TBI (mbTBI) is increasing due to terrorism. Thus, the mechanism of blast injury must be understood. This study aimed to assess chronic disability including immunohistological changes in the brain. We built and used a blast wave generator. The blast wave exited through a 20-mm I.D. nozzle aimed at the target. Rat brains showed no detectable injury at a nozzle-to-brain distance of 2.5cm. Peak shock wave pressure was  $646.2 \pm 70.3$  kPa. The mbTBI was evaluated by Iba1 immunoreactivity at 3 days and 1, 2, and 6 weeks after injury. A forced swim test and Y-maze test were performed 2 weeks after injury. Early post-injury food intake decreased significantly in the blast group rats and they lost weight compared to control. The blast group showed increased immobility time in the forced swim test at 2 weeks. Iba1 immunostaining show microglial accumulation in the hypothalamus at 2 weeks after injury. This model will allow more precise identification of the mechanism of mbTBI.

研究分野：救急医学・災害医学・中毒学・緊急被ばく医療

キーワード：衝撃波 爆傷 頭部外傷 記憶障害 うつ状態 行動試験 Iba-1

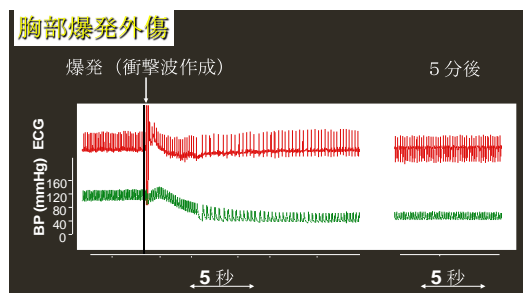
### 1. 研究開始当初の背景

近年、爆弾テロの報道は多く、紛争地域のみならずマラソン大会で一般市民が犠牲者になる等、負傷者数も年々増加しており、どの国でも生じうる世界的な脅威となっている。日本でも偶発的な爆発事故は存在し、実際に犠牲者が発生している。爆発に伴う損傷には特徴があり、未解明な部分も多い。

爆発によって含気のある臓器が損傷する事は、第一次世界大戦時、船を攻撃するための機雷が水中で爆発した際、水中にいた兵士の体表には損傷を認めないが腸管損傷、肺挫傷、鼓膜の損傷が生じる事、すなわち、含気のある臓器が損傷する事が知られていた。また、近年でも爆弾テロなどの犠牲者に体表に全く損傷を認めない症例が報告されている。興味深い事に爆発に伴う衝撃波が体内を通過する際、徐脈・血圧低下・無呼吸(あるいは浅く速い呼吸)の三徴候が生じる事が知られていた。

下の図はラットの胸部に衝撃波を通過させた際の心電図と動脈圧を示した私の研究結果である。衝撃波を作成した約 4.3 秒後に徐脈が生じ、約 2 秒後に血圧低下が生じている。すなわち潜時を経て徐脈や血圧低下を認める事から、これらは中枢神経を介した反射であると考えられた。腹部に衝撃波を通過させた場合には呼吸・循環動態に変化は生じない。

この呼吸・循環動態に生じる三徴候が迷走神経を介した反射によって生じる事を初めて明らかにし、そのメカニズムの検討を行ってきた (Ohnishi et al. Experimental Physiology 2001)。求心路は迷走神経であり、徐脈の遠心路は迷走神経心臓枝であることをアトロピンやコリンエステラーゼ阻害薬であるピロドスチグミンを用いて明らかに



した (Ohnishi et al. British Journal of Pharmacology 1998, Ohnishi et al. 日本外傷学会 2012)。

しかしながら、血圧低下や無呼吸のメカニズムに関しては依然明らかにはなっていない。また、肺に存在する J 受容体刺激による反射と現象は似ているが、複数の実験で J 受容体刺激であるとする仮説が否定される事を示してきた (Ohnishi et al. Journal of Physiology 1998)。

これらの研究は、胸部に衝撃波を照射した際に生じる呼吸・循環動態の変化を対象にし

ており、頭部に衝撃波が作用した際にどのような変化が生じるかは明らかではなかった。また、湾岸戦争やアフガニスタンの紛争において、兵士に外傷後ストレス症候群 (Post Traumatic Stress Disorder: PTSD) 様の精神的变化が生じることが問題となっていたが、近年、外傷後ストレス症候群の要素以外に爆発等で衝撃波が脳に作用することの影響が関与している可能性が示唆されている。このような背景の中で、衝撃波が頭部に作用する際の呼吸・循環動態の変化を検討すること、その後の PTSD 様の症状を再現できるようなラットモデルの開発が必要と考えられているが、いまだ実現に至っていない。現時点で実現されているいくつかもモデルは全身に衝撃波が作用しており、頭部以外の部位に作用した衝撃波の影響が無視できない。よって、衝撃波脳損傷に関するラットモデルの開発は急務であると考えられる。

### 2. 研究の目的

これまで研究を行ってきた際に使用した衝撃波作成装置と同等の装置を製作し、その装置を用いて、衝撃波を頭部に照射した場合の呼吸・循環動態の変化を検討すること。また、肉眼的に変化を来さないようなエネルギーの衝撃波を頭部に照射した後の行動変化を多角的に検討し、脳に生じた変化を検討しラットの blast induced mild traumatic brain injury (bmTBI) モデルを作成すること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 衝撃波発生装置の作成

高圧 (10MPa) の圧縮空気を用いてアルミニウムディスクに穴を開けることによって衝撃波を発生させる装置を作成した。

#### (2) 衝撃波を作用させる距離の決定、および衝撃波の圧測定

雄 Wister ラット (240g) の頭部に衝撃波を照射し、肉眼的に脳に出血や脳挫傷を来さないような衝撃波射出孔とラットまでの距離を決定した。また、10 万 Hz の時間分解能をもつ圧センサーを用いて、この距離における衝撃波の圧力変化を測定した。また、衝撃波の空間における伝播の様子を高速度ビデオカメラを用いて撮影記録した。

#### (3) 衝撃波の作用点による違い (胸部と頭部に照射した場合の循環動態の変動)

ラットに心電図を記録し、尾動脈へのカニューレーションによる動脈圧測定を行い、頭部および胸部に衝撃波を照射した際の、循環動態の変化を記録した。これまでの研究通り、衝撃波を胸部に照射した場合、徐脈・血圧の低下が生じることを確認すると同時に、同じ衝撃波のエネルギーを頭部に照射した場合、循環動態に生じる変化を検討した。

#### (4) 頭部衝撃波照射後の行動

衝撃波照射後にラットに生じる行動の変化を以下の 3 つの方法で観察した。

(a) 衝撃波照射後の食物摂取量と体重変化

衝撃波を頭部に照射した後、経日的にラットの体重および食物摂取量を測定し、音のみ聴かせて衝撃波を照射しなかったコントロール群と比較した。

(b) 衝撃波照射後の自発行動量と空間作業記憶に関する評価（Y 迷路試験）

ラット頭部への衝撃波照射 2 週間後に、Y 迷路を用いて Y 迷路のアームに侵入した回数からラットの自発行動量を観察した。また、3 回連続して異なるアームに侵入した回数をカウントし、アームの総侵入回数から 1 を引いた値で除したあとに 100 を乗ずることで求めることが出来る空間作業記憶を測定した。

(c) 衝撃波照射後の鬱状態に関する評価（強制水泳試験）

ラットの抑鬱様行動を評価することが可能とされる強制水泳試験を、ラット頭部への衝撃波照射 2 週間後に行った。ラットを水槽に投入すると、当初は泳ぎ回るがそのうちに水に浮いたまま動かなくなる（無動となる）状態を呈した。この無動時間を抑鬱状態の指標として計測した。

(5) 衝撃波照射後の脳の経時的免疫組織化学的变化

ラット頭部への衝撃波照射後 3 日、1 週間、2 週間、6 週間後におけるラット脳を活性化マクロファージのマーカーとして利用される IBA1 抗体を用いた免疫組織化学的变化を検討した。検討部位は neocortex、olfactory bulb、hippocampal、brain stem、thalamus、hypothalamus とした。

#### 4. 研究成果

(1) 衝撃波発生装置

安全に衝撃波を発生させることが出来る装置を、Jonathan らの報告（Jonathan et al. Journal of Trauma 1987）をもとに作成した（フェニックス・テクノ株式会社 大阪）。高圧圧縮空気を 10MPa に減圧し 150ml の容器に格納し、その空気をエアコンプレッサーを用いたバルブを開くことにより、0.3mm 圧のアルミニウムディスクを円形に打ち抜き、その際に衝撃波が発生するようにした。

(2) 頭部への衝撃波照射の距離設定、および衝撃波の圧測定

この衝撃波発生装置を用いてラットの頭部に衝撃波を照射し、肉眼的にラット脳に変化を来していない距離を 2.5cm と決定した。この距離は衝撃波発生装置のノズル開口部からラット頭皮までの距離とした。（アルミニウムディスクからの距離測定が衝撃波発生部からの距離となるが、ディスクはノズル内

部にあり実験中の距離測定が困難であるため。）

実際に衝撃波が発生していること、また衝撃波のエネルギー（圧力）を計測した。衝撃波の圧力は  $646.2 \pm 70.3 \text{ kPa}$  であった。測定は 10 万 Hz の時間分解能を持つ素子を用いなければならなかった。（これ以下の時間分解能の素子では計測できなかった。）また、高速ビデオカメラで衝撃波撮影を行った。ノズル先端から球面波（ビデオ上は円弧）として衝撃波が射出されている様子を記録することが出来た。

以上より、衝撃波発生装置から実際に衝撃波が照射可能であることを確認した。

(3) 衝撃波照射部位と循環動態

衝撃波を胸部に照射すると、過去に確認した通り迷走神経反射で生じる徐脈・血圧の低下が再現された。ただし、2.5cm の距離では徐脈時間が長く 10 病程度の心停止を来しており、submaximal な距離とは言えないため胸部への衝撃波照射実験を行う際のノズルからラットまでの距離は再考する必要があった。（今回の頭部照射実験には影響しない）

衝撃波を頭部に照射したところ、脈拍・血圧に変化は認められなかった。頭部衝撃波照射モデルのラット脳には全身の循環動態の変動の影響は無い、即ち血圧の低下によって脳循環が障害されるとは考えにくいことを確認した。

(4) 頭部衝撃波照射後の行動研究

(a) 食物摂取量と体重に関する評価

衝撃波発生音のみを聴かせたコントロール群ではラット 3 匹あたり 1 日約 50g~60g の餌を摂取し、日々体重が増加していたが、頭部衝撃波照射群では 1 日目 15g、2 日目 35g と明らかに少なく、照射後 3 日程度は体重が約 20g 減少し、その後体重が増加に転じた。増加に転じた後の 1 日あたりの体重増加量はコントロール群と同程度であった。

(b) 自発行動量と空間作業記憶に関する評価

衝撃波照射後 2 週間経過したラットを用いて Y 迷路での自発行動量を検討したところ、Y 迷路のアームに入った回数はコントロール群、頭部衝撃波照射群では差を認めなかった。コントロール群では 8 回~10 回程度、照射群では 6 回から 11 回程度であった。実験回数が少ないため統計学的検討は行っていないが、有意な差は生じないと考えられた。

一方で空間作業記憶に関しては、頭部衝撃波照射群はコントロール

群に比較して低下していた。異なるアームへの侵入はコントロール群が多く(90~100%)、照射群では少なく(55~85%)、記憶の低下が示唆された。こちらも実験回数が少ないため統計学的検討は未実施であるが、回数を増やす予定である。

(c) 鬱状態に関する評価

衝撃波照射後 2 週間経過したラットを用いて強制水泳試験を行ったところ、無動時間の有意な延長が確認された( $p=0.006$ )。衝撃波照射により鬱状態のような反応が生じることが確認された。

(5) 脳の免疫組織学化学的検討

衝撃波照射 3 日後、1 週間後のラット脳切片において Iba1 で染色される部分は確認できなかった。照射 2 週間後では、hippocampal や thalamus には変化を認めなかったが、brain stem や hypothalamus において Iba1 で染色される部位が確認された。照射 6 週間後では、neocortex はほとんど染まらないものの、olfactory bulb では若干染色されており、brain stem、thalamus、hypothalamus では数多くの染色部位を認めた。

経時的に活性化マクロファージが thalamus や hypothalamus に集積している可能性が示唆された。

研究(1)~(3)より頭部に衝撃波を照射する装置を作成した上で、頭部への衝撃波照射では循環動態に変化を来さないことが確認できた。

研究(4)より、頭部衝撃波照射後数日間の摂食量の低下と体重減少、2 週間経過後に短期記憶障害や鬱状態が生じている可能性が示唆された。実験数を統計的解析が出来るまで増やすことと、2 週間より長期、例えば 6 週間経過した時点でこれらの障害がさらに悪化するのか、改善するのか、経時的検討をさらに行う必要があると考えている。

研究(5)より、肉眼的に変化を来さない衝撃波照射脳において、経時的にマクロファージが集積してくる可能性が考えられた。しかし、マクロファージの形態学的検討が不十分であり検討する必要がある。

以上より、ラットに対する衝撃波照射装置を作成し、ラット頭部に衝撃波を照射し、鬱状態や短期記憶障害が生じることが確認でき、経時的にラット脳にマクロファージが集積してくるような変化を来していることが示唆された。全身への衝撃波の影響を最小限にした衝撃波脳損傷メカニズムを解明するために理想的なモデルである。将来的にはテロ等での爆傷を受傷し、その後、記憶障害や PTSD 様の精神的変化を来す病態の解明・治療法の開発のためのモデルとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Ohnishi M. Physiological Response to Primary Blast Injury. Japan-US Technical Information Exchange Forum on Blast Injury (JUFBI 2016) 東京 2016

Matsuura H, Ohnishi M, Hosomi S, Shimazu T. Mild Blast Induced Traumatic Brain Injury – A Novel Laboratory Rat Model of Focused Exposure to the Head. Japan-US Technical Information Exchange Forum on Blast Injury (JUFBI 2018) 東京 2018

Matsuura H, Ohnishi M, Hosomi S, Shimazu T. For Treatment of Blast Induced Mild Traumatic Brain Injury – Establishment of the Focused Exposure to the Head Experimental Model 日本外傷学会総会・学術集会 京都 2018

Matsuura H, Ohnishi M, Hosomi S, Shimazu T. Mild Blast-Induced Traumatic Brain Injury – A Laboratory Rat Model of Focused Exposure to the Head. The 77<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for the Surgery of Trauma. サンディエゴ 米国 2018 (採択済み)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 光雄 (OHNISHI Mitsuo)  
大阪大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70597830

(2) 研究分担者

廣瀬 智也 (HIROSE Tomoya)  
大阪大学医学系研究科・招聘教員  
研究者番号：70597509

松本 寿健 (MATSUMOTO Hisatake)  
大阪大学医学系研究科・招聘教員  
研究者番号：70644003

姜 晋求 (Kang Jinkoo)

大阪大学医学系研究科・大学院  
(2017年3月末削除)  
研究者番号：50721114

嶋津 岳士 (SHIMAZU Takeshi)  
大阪大学医学系研究科・教授  
研究者番号：50196474

(3)連携研究者

松浦 裕司 (MATSUURA Hiroshi)  
大阪大学医学系研究科大学院  
研究者番号：10791709

細見 早苗 (HOSOMI Sanae)  
大阪大学医学系研究科・招聘教員  
研究者番号：90644005